



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

JULIANA CARDOSO ALVES

**ESTUDO SOBRE A PARTICIPAÇÃO DO CCR3 NA MIGRAÇÃO DOS  
EOSINÓFILOS PARA O ÚTERO DE CAMUNDONGOS INDUZIDA POR  
ESTROGÊNIO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

SÃO CRISTÓVÃO

2016

JULIANA CARDOSO ALVES

**ESTUDO SOBRE A PARTICIPAÇÃO DO CCR3 NA MIGRAÇÃO DOS  
EOSINÓFILOS PARA O ÚTERO DE CAMUNDONGOS INDUZIDA POR  
ESTROGÊNIO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
como requisito parcial à obtenção do grau de  
Bacharelado em Farmácia, pela Universidade  
Federal de Sergipe.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Renata Grespan

SÃO CRISTÓVÃO

2016

## RESUMO

Os eosinófilos são comumente descritos como células pertencentes a imunidade inata que apresentam papel contra infecções parasitárias e na patogênese de doenças de hipersensibilidade. Nas últimas décadas, novas funções estão sendo descritas para essas células, tais como: a atuação como células apresentadoras de antígenos, no remodelamento e reparo tecidual, na proliferação de músculo liso, na manutenção da homeostase metabólica, na formação do processo fibrótico na endometriose, nas doenças inflamatórias intestinais, além da presença dessas células no útero. Desde a década de 1960, tem sido relatada a migração seletiva de eosinófilos induzida por 17- $\beta$ -estradiol para o útero de ratas castradas. Entretanto, não se sabe muito bem o modo como ocorre esse recrutamento de eosinófilos para o tecido uterino. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a participação do receptor CCR3 nesse processo de migração celular. Para isso, foram realizados experimentos para determinar a dose e o tempo-resposta do 17- $\beta$ -estradiol em que ocorre a migração eosinofílica, a análise da peroxidase de eosinófilos (EPO), a demonstração da migração dos eosinófilos em resposta a administração da CCL-11, a determinação da dose do antagonista do receptor CCR3 (SB 328437), avaliação do efeito do extrato do tecido uterino na migração celular e a verificação do efeito do antagonista CCR3 no útero. Desse modo, os resultados demonstraram que a dose de 100  $\mu$ g/kg do 17- $\beta$ -estradiol no tempo de 24 horas promoveu um aumento da massa do útero, bem como a CCL-11 na dose de 0,08pmol/kg recrutou eosinófilos e que o antagonista do receptor CCR3 (SB 328437) na dose 3mg/kg reduziu significativamente a presença de eosinófilos no tecido uterino. Assim, pode-se concluir o envolvimento do receptor CCR3 na migração de eosinófilos para o útero induzida por 17- $\beta$ -estradiol.

**Palavras-Chave:** Eosinófilos; migração; 17- $\beta$ -estradiol; receptor CCR3.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – 17- $\beta$ -estradiol induz aumento de massa de útero de maneira dose dependente.....	18
<b>Figura 2</b> - 17- $\beta$ -estradiol (100 $\mu$ g/kg) induz aumento de massa de útero de maneira tempo dependente.....	19
<b>Figura 3</b> - Determinação da medida da absorbância de peroxidase de eosinófilo (EPO).....	21
<b>Figura 4</b> - Efeito da CCL11 em modelo de bolha de ar.....	22
<b>Figura 5</b> - Efeito do antagonista CCR3 (SB 328437) sobre a migração de leucócitos induzida por CCL11.....	23
<b>Figura 6</b> - Tempo resposta do extrato de útero na migração de leucócitos em modelo de bolha de ar.....	25
<b>Figura 7</b> - Efeito do antagonista CCR3 (SB 328437) sobre a massa de diferentes órgãos induzida por 17- $\beta$ -estradiol (100 $\mu$ g/kg de peso, s.c.).....	26
<b>Figura 8</b> - Corte histológico.....	27

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	6
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	7
2.1 EOSINÓFILOS .....	7
2.1.1 PROTEÍNAS CITOTÓXICAS DOS EOSINÓFILOS .....	8
2.2 CITOCINAS E QUIMIOKINAS .....	9
2.3 ESTRADIOL E TECIDO UTERINO .....	10
3. OBJETIVOS .....	12
3.1 OBJETIVOS GERAL .....	12
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	12
4. METODOLOGIA .....	13
4.1 ANIMAIS .....	13
4.2 OOFORECTOMIA .....	13
4.3 DETERMINAÇÃO DA DOSE E TEMPO-RESPOSTA DO 17- $\beta$ -ESTRADIOL NA MIGRAÇÃO DE EOSINÓFILOS .....	13
4.4 ANÁLISE DA PEROXIDASE DE EOSINÓFILOS .....	14
4.5 MODELO DE BOLHA DE AR .....	14
4.5.1 CCL-11 .....	15
4.5.2 ANTAGONISTA CCR3 .....	15
4.5.3 EXTRATO DE ÚTERO .....	15
4.5.4 CONTAGEM TOTAL DE LEUCÓCITOS .....	16
4.5.5 CONTAGEM DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS .....	16
4.6 EFEITO DO ANTAGONISTA CCR3 SOBRE A MASSA DOS ÓRGÃOS .....	16
4.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA .....	17
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	17
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	17
7. CONCLUSÃO .....	28
8. REFERÊNCIAS .....	29

## 1. INTRODUÇÃO

Os eosinófilos, granulócitos polimorfonucleares, são células que fazem parte da imunidade inata, originados na medula óssea e seus grânulos citoplasmáticos possuem afinidade por corantes ácidos como a eosina. Essas células são reconhecidas, principalmente, por sua ação citotóxica contra patógenos parasitários e em danos teciduais decorrentes de processos alérgicos (SHAMRI et al., 2011).

Nas últimas décadas, diversas funções para os eosinófilos estão sendo descritas tais como: remodelamento e reparo tecidual (ACEVES et al., 2011), proliferação de músculo liso arterial na hipertensão pulmonar (WENG et al., 2011), manutenção da homeostasia metabólica (CHAWLA et al., 2011), nas doenças inflamatórias intestinais atuando no remodelamento tecidual e na resposta inflamatória (LAMPINEN et al., 2008), participação no trabalho de parto e no pós-parto (TIMMONS et al., 2009) e no processo de formação de fibrose na endometriose (JACOBESSEN et al., 2014), bem como, a presença dessas células no tecido uterino (DIENER et al., 2016).

A migração de eosinófilos para útero tem sido relacionada aos níveis de estrógeno desde a década de 1960, quando foi relatado pela primeira vez o aumento de eosinófilos no útero de ratas, sob estímulo do estradiol (ROSS et al., 1966), como um marco no desenvolvimento e remodelamento do tecido uterino (LUQUE et al., 1998).

O extravasamento de leucócitos da circulação sanguínea para dentro do tecido é um processo complexo que envolve a expressão de moléculas de adesão e seus receptores nos leucócitos e nas células endoteliais, assim como, a produção de citocinas e quimiocinas pelas células residentes nos tecidos (ZHANG, 2000).

A quimiocina CCL-11 é seletiva para eosinófilo, pertencente à família C-C, que atua em receptores CCR3 presentes nessas células. Apresenta-se em níveis elevados no intestino delgado, cólon, coração, rim, pâncreas (GARCIA-ZEPEDA et al., 1996), e no útero (HICKEY et al., 2013) e em níveis mais baixos em outros tecidos incluindo o pulmão, fígado, ovário e placenta (GARCIA-ZEPEDA et al., 1996).

A partir do exposto acima, esse estudo visa investigar a participação do receptor CCR3 na migração de eosinófilos para o útero de camundongos fêmeas castradas induzida pelo 17- $\beta$ -estradiol.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Eosinófilos

Os eosinófilos são originados a partir de células hematopoéticas CD34<sup>+</sup> na medula óssea, derivadas da linhagem mielóide, que após maturação circulam pela corrente sanguínea em níveis relativamente baixos, representando de 1-3% dos leucócitos totais presentes no sangue (UHM et al., 2012), até serem recrutados para um determinado tecido onde irão atuar liberando suas proteínas granulares, citocinas e mediadores lipídicos (CARVALHO et al, 2003; ROTHENBERG, 1998).

O termo eosinófilo foi introduzido em 1879 por Paul Ehrlich quando foram identificadas células que eram coradas através de compostos ácidos, como a eosina. Esta coloração é devido a presença de proteínas catiônicas presente nos grânulos existentes no citoplasma dessas células (EGESTEN et al., 2001). Os grânulos são classificados em: primários, secundários e pequenos. Os grânulos primários aparecem nos primeiros estágios da maturação, não apresentam núcleo, variam em tamanho e são maiores que os grânulos secundários e neles são encontrados a proteína dos cristais de Charcot-Leyden. Os grânulos secundários ou específicos são responsáveis pela coloração característica dos eosinófilos devido a presença de: proteína básica maior, proteína catiônica eosinofílica, peroxidase eosinofílica e neurotoxina derivada de eosinófilos (ACHARYA, ACKERMAN, 2014). Os grânulos pequenos contêm arilsulfatase B e fosfatase ácida.

O eosinófilo ativado adquire características morfológicas, fenotípicas e funcionais distintas da célula quiescente. Dentre as modificações que sofre estão: diminuição da densidade (DANESHPOUY, 2002), aumento das funções citotóxicas, aumento da meia-vida, que passa de algumas horas para dias, aumento da síntese de mediadores, como leucotrienos (LCT4); aumento da produção de citocinas, IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, GM-CSF e IFN- $\gamma$ , com efeitos de natureza autócrina e parácrina, que têm ação reguladora sobre os linfócitos T-auxiliares (Th2) presentes no sítio de inflamação; aumento das propriedades de adesão ao endotélio vascular e aumento da capacidade de migração para os tecidos (SKUBITZ, 2004).

Na ausência de citocinas, a morte do eosinófilo ocorre por apoptose, processo controlado e programado. A apoptose é o método pelo qual o eosinófilo é removido durante a homeostase normal dos tecidos e se caracteriza pela diminuição do tamanho da célula, condensação da cromatina, preservação da integridade da membrana

plasmática e fragmentação do DNA. A célula se fragmenta em corpos apoptóticos que são rapidamente englobados por macrófagos, por isso são raramente vistos em tecidos (ERJEFÄLT et al., 2000; GIEMBYCZ et al., 1999).

### **2.1.1 Proteínas citotóxicas dos eosinófilos**

A proteína básica maior é assim denominada por ser a proteína eosinofílica mais abundante, possui 14 kD, contem 17 resíduos de arginina (POPKEN-HARRIS et al., 1998). Seu mecanismo de ação citotóxico envolve a ligação da MBP na membrana celular causando o desordenamento da camada lipídica aumentando a permeabilidade celular devido a sua carga negativa. Atua contra helmintos, o epitélio das vias aéreas e possui efeitos contra bactérias (HOGAN et al. 2008).

A neurotoxina derivada de eosinófilos é uma pequena proteína pertencente à família das ribonucleases A, conhecida como RNase-2. É uma das RNases mais abundantes nos seres humanos e pode ser isolada a partir do próprio eosinófilo, fígado, placenta e urina (ABU-GHAZALEH et al., 1998). Foi identificada assim após promover danos neurológicos quando injetada no cérebro de coelhos, denominado fenômeno de Gordon (GLEICH et al., 1986). Essa neurotoxina ativa células dendríticas humanas que induz a expressão de uma variedade de quimiocinas, citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e receptores solúveis (YANG et al., 2004), bem como aumenta as respostas imunitárias via Th2 (YANG et al., 2008).

A proteína catiônica eosinofílica é um polipeptídeo pequeno conhecida como RNase-3, quando comparada com a NDE (pI = 8,9), é considerada mais catiônica apresentando pI igual a 10.8 (ABU-GHAZALEH et al., 1998), sua atividade como ribonuclease é 100 vezes menor e também induz o fenômeno neurotóxico de Gordon (FREDENS et al., 1982). Atua contra parasitas, bactérias, vírus de RNA de cadeia simples e tecidos do hospedeiro (ROSENBERG, 1995).

Os níveis séricos da proteína catiônica eosinofílica podem ser utilizados como ferramenta clínica para estimar a atividade inflamatória dos eosinófilos na asma e em outras doenças alérgicas, tendo sido descrito que esse critério está correlacionado com a gravidade da doença. A atividade antibacteriana e anti-helmíntica parece não está relacionada com sua ação de ribonuclease e sim com a criação de poros nas membranas de células alvo que podem causar a lise osmótica ou facilitar a entrada de outras moléculas tóxicas (DOMACHOWSKE et al., 1998; EGESTEN et al., 2001).



A peroxidase eosinofílica é uma hemoproteína de duas cadeias (68 kDa), inicialmente sintetizada como um precursor de cadeia única que é proteoliticamente processada dividindo-se em uma cadeia pesada de 55 kDa e cadeia leve de 12,5 kDa, que utiliza o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) como substrato para gerar espécies oxidantes potentes. As evidências bioquímicas sugerem que essa peroxidase está estruturalmente relacionada com a mieloperoxidase presente em grânulos específicos de neutrófilos, mas constatou-se que em pacientes com deficiência de mieloperoxidase têm níveis normais de peroxidase eosinofílica, indicando mecanismos independentes de expressão para estas peroxidases (ACHARYA, ACKERMAN, 2014).

## 2.2 Citocinas e quimiocinas

Muitas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento também são armazenados nos grânulos específicos, os quais ajudam a regular a resposta imunológica do hospedeiro atuando de várias formas: na regulação autócrina através de IL-5, GM-CSF, CCL-11 (ROBERTSON et al., 2006), desempenhando um papel crítico na quimiotaxia e manutenção dos eosinófilos dentro do tecido e na imunomodulação a partir da produção de IL-4, IL-13 e IL-25 (WANG et al., 2007). Além disso, promove a atuação do sistema imunológico via Th2 contribuindo com citocinas pró-inflamatórias como a IL-6, fator de necrose tumoral ( $TNF-\alpha$ ) na promoção de danos teciduais e alterando o fator de crescimento  $\beta$  ( $TGF-\beta$ ). Sendo este responsável pelo aumento da proliferação de fibroblastos, bem como da síntese de colágeno no processo de remodelamento tecidual (MEDOFF et al., 2008).

As citocinas IL-3, IL-5 e GM-CSF são importantes na regulação e desenvolvimento dos eosinófilos. Esses mediadores são capazes de aumentar a sobrevivência dos eosinófilos e juntamente com  $IFN-\gamma$  e  $TNF-\alpha$ , de ativá-los (KITA et al., 1992).

A migração de eosinófilos para os tecidos é iniciada por moléculas quimioatraentes, as quais incluem derivados do ácido araquidônico como leucotrieno B<sub>4</sub>, mediadores lipídicos como fator ativador de plaquetas (PAF), produtos de bactérias e várias quimiocinas. Durante a migração, ocorrem interações entre os eosinófilos e as células endoteliais através da expressão de moléculas de adesão.

A adesão ao endotélio vascular é realizada através de selectinas, integrinas e de seus ligantes. As integrinas incluem a família  $\beta_2$  e  $\beta_1$ , dentre as quais as moléculas *very*

*late antigen 4* (VLA-4). As integrinas  $\beta 2$  interagem com a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), enquanto as integrinas  $\beta 1$  interagem com a molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1). Apesar da interação  $\beta 2$ -ICAM1 ser utilizada por todos os leucócitos, a interação VLA4-VCAM1 é usada por eosinófilos e células mononucleares. A expressão de ICAM-1 é induzida por uma variedade de mediadores pró-inflamatórios como IL-1 e (TNF $\alpha$ ), enquanto VCAM-1 é induzida primariamente por IL-4 (KITA e GLEICH, 1996; VALENT, 1994; TEPPER, 1994). A ligação de eosinófilos ao endotélio ativado é primariamente mediada através de interações VLA4-VCAM1 e antígenos funcionais de linfócitos 1 (LFA-1) -ICAM1 (TEPPER, 1994).

As quimiocinas são definidas como citocinas quimiotáticas que controlam a migração de leucócitos, funcionando como coordenadoras de tráfego celular durante reações imunológicas e inflamatórias, bem como potentes ativadoras dessas células (PAPADAKIS et al., 2000; KUNKEL et al., 2003). Além disso, existem evidências sobre a expressão constitutiva de algumas quimiocinas em determinados tecidos que são responsáveis pela imunovigilância e homeostase dos tecidos (KUNKEL et al., 2003).

O recrutamento de leucócitos para o endométrio envolve algumas quimiocinas como a IL-8 (JONES et al., 1997), as proteínas quimiotáticas de monócitos (MCP) 1 e 2 (HAMPTON et al., 2001), a proteína inflamatória de macrófagos (MIP-1) (AKIYAMA et al., 1999), eotaxina (ZANG et al., 2000), e a CCL-5 (RANTES) responsável por atrair linfócitos T (HORNUNG et al., 1997).

A quimiocina CCL-11 (eotaxina) é seletiva para o recrutamento de eosinófilos, sendo sua produção induzida por citocinas pró-inflamatórias vários tipos celulares como células endoteliais, linfócitos T e monócitos. As células epiteliais das vias aéreas expressam a CCL-11 em resposta ao fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), IL-1 ou ao interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) (GARCIA-ZEPEDA et al., 1996). Além disso, a CCL-11 é produzida por fibroblastos, a IL-4 parece ser particularmente importante para a indução da produção dessa quimiocina no tecido cutâneo (MOCHIZUKI et al., 1998) e foi descrito a presença de CCL-11 e o seu receptor, o CCR3, no endométrio humano (ZHANG et al., 2000).

### **2.3 Estradiol e tecido uterino**

O número de eosinófilos no endométrio de animais roedores varia de acordo com o ciclo estral: proestro, estro, metaestro e diestro (DIENER et al., 2016). Durante

este ciclo, as células do tecido uterino passam pelas fases de proliferação, diferenciação e recrutamento em resposta a elevação e diminuição da concentração de estrógeno e progesterona. Os níveis séricos de estrógeno começam a aumentar no proestro quando ocorre a proliferação das células uterinas e diminuem no final do estro quando as células sofrem apoptose. Juntamente com a indução da proliferação celular, o estrogênio também é responsável pelo recrutamento de leucócitos a partir da corrente sanguínea para o compartimento estromal (MARTIN, 1973; MARCUS, 1974). Na fase estro, o animal fica mais susceptível ao acasalamento e apresenta maior número de eosinófilos no útero. Quando o embrião é fixado à parede uterina, ocorre um decréscimo na quantidade desses leucócitos permanecendo assim durante todo o desenvolvimento embrionário (DIENER et al., 2016).

Gouon-Evans e Pollard demonstraram em 2001, que camundongos deficientes de CCL-11 e IL-5 permanecem com a capacidade de implantação e o desenvolvimento embrionário intactos quando o número de eosinófilos endometriais está diminuído ou ausente. No entanto, animais que são deficientes em CCL-11 exibem um atraso no início do ciclo estral, enquanto, os deficientes em IL-5, parecem apresentar um ciclo estral ligeiramente mais longo (ROBERTSON et al., 2000). Estes resultados podem sugerir um papel para os eosinófilos no processo de maturação do útero e na capacidade da resposta uterina ao estrogênio.

Recentemente, Doisne e colaboradores (2015) constataram a presença de células linfóides inatas (ILCs), especificamente a ILC-2, no útero de camundongos fêmeas C57/BL6 confirmando descobertas anteriores de que as ILCs-2 controlam eosinófilos na homeostase através de um mecanismo dependente de IL-5. As ILCs são linfócitos inatos que estão presentes na pele, pulmão, intestino, tecido adiposo e alguns órgãos linfóides associados a mucosas (SPITS et al., 2013; WALKER et al., 2013; SONNENBERG et al., 2013), além de sua presença ter sido relatada no endométrio (DOISNE et al., 2015). Detalhadamente, as ILCs estão subdivididas em três grupos: as ILCs-1, que incluem as células produtoras de IFN- $\gamma$  e se assemelham as células natural killer (NK) convencionais, podendo ser encontradas no baço, fígado (DAUSSY et al., 2014) e intestino (ROBINETTE et al., 2015). As ILCs-2 produzem IL-5, IL-13, anfiregulina, IL-9, IL-10, IL-6 e em menor quantidade IL-4 (WALKER et al., 2013) como resposta as citocinas IL-25 e IL-33 (MJÖSBORG et al., 2011). Elas podem ser encontradas no tecido adiposo, nódulos linfáticos, intestino, nas vias aéreas participando da inflamação

pulmonar e na asma, além de atuar na remoção de parasitas intestinais. As ILCs-3 liberam IL-17 e/ou IL-22 (CORDING et al., 2014) após estimulação de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-23, desempenhando papel importante na imunidade intestinal e na homeostase de mucosas (BUONOCORE et al., 2010; SAWA et al., 2010).

A secreção de IL-5 e IL-13 pelas ILCs-2 durante a inflamação resulta em produção de CCL-11 localizada e conseqüentemente no acúmulo de eosinófilos. No intestino delgado onde os eosinófilos e a CCL-11 são constitutivos (MISHRA et al., 1999), as ILCs-2 colaboram para a regulação da eosinofiloiose basal e no acúmulo de eosinófilos no tecido através da produção de IL-5 (NUSSBAUM et al., 2013). As ILCs-2 respondem as IL-25 e IL-33 ambas encontradas anteriormente na mucosa uterina durante a gravidez desempenhando papel importante no remodelamento do tecido uterino (ROBERTSON et al., 2000).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a participação do receptor CCR3 na migração de eosinófilos para o útero de camundongos induzida pelo 17- $\beta$ -estradiol.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Padronizar as condições de migração de eosinófilos para o útero de camundongos fêmeas castradas induzida por 17- $\beta$ -estradiol;
- Verificar o efeito do antagonista de CCR3, SB328437, e observar o efeito do extrato uterino de animais castrados tratados com o 17- $\beta$ -estradiol na migração celular através do modelo de bolha de ar em camundongos fêmeas C57/BL6;
- Analisar o efeito do antagonista SB328437 em diferentes órgãos de camundongos fêmeas castradas estimuladas com 17- $\beta$ -estradiol;

### **4. METODOLOGIA**

#### **4.1 Animais**

Foram utilizados camundongos fêmeas C57/BL6 pesando entre 20 e 25 g provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia (DFS) e os mesmos foram mantidos até o experimento no Laboratório de Farmacologia do Processo Inflamatório (LAFAPI) da Universidade Federal de Sergipe (UFS). Os animais foram divididos em grupos experimentais de acordo com cada tipo de experimento a ser

realizado (n=10 por grupo) e permaneceram em condições padrões de alojamento, com ciclo de luz claro/escuro (12 h), temperatura controlada ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) com suprimento de água e ração à vontade. Os protocolos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA), com número de processo 38/2014, da Universidade Federal de Sergipe (UFS).

#### **4.2 Ooforectomia**

Os camundongos fêmeas C57/BL6 foram submetidos à ooforectomia bilateral, que é a técnica cirúrgica para a retirada dos ovários, através de uma incisão dorsal sob anestesia com ketamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Antes da cirurgia (6h), os animais receberam Flunixin meglumine, via oral, na dose 2 mg/kg, como medida profilática. Após a cirurgia, os animais receberam o Flunixin meglumine, por via oral, na dose 1 mg/kg a cada 24 horas por 7 dias, como terapia pós-operatória. Os animais permaneceram no biotério do LAFAPI e os experimentos foram realizados após 15 dias.

#### **4.3 Determinação da dose-resposta e tempo-resposta da migração de eosinófilos induzida por 17- $\beta$ -estradiol**

Foram administrados em camundongos fêmeas castradas, após 15 dias da castração, as doses (0,1; 1; 10; 30; 100 e 300  $\mu\text{g/kg}$  de peso, s.c.) de 17- $\beta$ -estradiol com o objetivo de determinar a dose em que ocorreria o maior aumento da massa do útero. No grupo de animais usado como controle foi injetado somente com o veículo (óleo de Sésamo) e submetido aos mesmos procedimentos. Após determinar a dose em que ocorreu o aumento da massa do útero, foram realizados experimentos com o objetivo de determinar o tempo em que ocorreria esse aumento. Para isso, foi utilizada a dose 100  $\mu\text{g/kg}$  de peso, s.c. e após o estímulo, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical em vários tempos (4, 8, 12, 24 e 48 horas). No grupo de animais usado como controle foi injetado somente o veículo (óleo de Sésamo) e submetido aos mesmos procedimentos. Os órgãos: útero, baço, diafragma e bexiga foram removidos e pesados.

#### **4.4 Análise da peroxidase de eosinófilos (EPO)**

Após 24 horas da administração do 17- $\beta$ -estradiol (100  $\mu$ g/kg de peso, s.c.) e do óleo de Sésamo em camundongos fêmeas castradas, os úteros foram coletados, pesados, homogeneizados, centrifugados (3000 g por 10 min.) e o sobrenadante descartado.

A homogeneização do tecido foi realizada em PBS pH 7,4 na proporção de 1,9 mL de PBS para cada 100 mg de tecido. As hemácias presentes no sedimento foram lisadas através da adição de solução hipotônica (1,5 mL de solução de NaCl a 0,2 %), aguardou-se 30 segundos para reestabelecer a osmolaridade com a adição de 1,5 mL de solução salina 1,6 % contendo 5% de glicose.

Após o reestabelecimento da osmolaridade centrifugou-se novamente a 3000 g por 10 min. Após a centrifugação, descartou-se novamente o sobrenadante e o material foi ressuspensionado em 1,0 mL de HTAB 0,5% em tampão fosfato pH 7,4. O material foi novamente homogeneizado e submetido a 3 ciclos de congelamento em gelo seco/etanol e descongelamento em banho-maria a 37° C a fim de romper as vesículas que contém peroxidase.

As amostras foram novamente centrifugadas 3000 g por 10 minutos e o sobrenadante usado no ensaio. Durante o experimento manteve-se os tubos sempre em banho de gelo.

Para o ensaio, adicionou-se 75  $\mu$ L da amostra e 75  $\mu$ L de substrato de peróxido de hidrogênio e disparou-se o cronômetro. A reação foi interrompida pela adição de 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1M.

**Ensaio enzimático:** Adicionou-se de 75  $\mu$ L de cada amostra a 75  $\mu$ L da solução contendo o substrato peróxido de hidrogênio (O-phenylenediamina dihydrochloride, OPD – 1,5 mM, em tampão Tris-HCl – 75 mM, pH 8 suplementado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – 6,6 mM). A reação foi interrompida pela adição de 50  $\mu$ L de solução de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 1 M. A intensidade da cor foi mensurada através da leitura da absorbância no espectrofotômetro em comprimento de onda 492 nm.

#### 4.5 Modelo de Bolha de ar

Os camundongos foram anestesiados por via inalatória com halotano, em seguida os animais foram depilados na região dorsal média e foram injetados 2,5 mL de ar estéril via s.c. no dia 0. No dia 3 foi realizado o retoque da bolha de ar com o mesmo volume de ar estéril e no dia 6 foram realizados três protocolos experimentais: indução

da migração de eosinófilos pela CCL-11, determinação da dose do antagonista do CCR3, e avaliação do efeito do extrato de útero sobre a migração celular.

Ao final de cada experimento os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, de acordo com o tempo determinado para cada procedimento, sendo realizado o lavado na bolha de ar com 1,5 mL de PBS/EDTA e posteriormente as amostras foram analisadas através de contagem total e diferencial dos leucócitos.

#### **4.5.1 CCL-11 (Eotaxina)**

A CCL-11 recombinante de camundongo foi obtida pela R&D System e reconstituída em 100 µg/mL de PBS contendo 1% de albumina sérica bovina. Foi aplicado 0.08 pmol/kg de CCL-11 em PBS na bolha de ar por animal e o lavado foi coletado 4 horas após a injeção, sendo essa dose e tempo baseados em estudos anteriores (ELLYARD et al., 2007; OKIGAMI et al., 2007). O grupo controle recebeu 100 µL de PBS estéril por animal.

#### **4.5.2 Antagonista CCR3**

O antagonista SB328437 obtido da empresa Sigma-Aldrich foi dissolvido em PBS contendo 0,1% de Tween 80. As doses de SB328437 (1, 3 e 10 mg/kg) foram administradas via s.c 30 minutos antes da injeção da CCL-11 (0.08 pmol/kg), baseado em dados da literatura (MORI et al., 2007). Ainda, outro grupo experimental recebeu somente o estímulo com a CCL-11 e outro apenas o PBS estéril (controle negativo). Após 4 horas da injeção de CCL-11 ou de PBS foi realizada a coleta do lavado na bolha de ar.

#### **4.5.3 Extrato de útero**

Após o tempo de recuperação da ooforectomia um grupo de animais foi tratado com 17-β-estradiol (100 µg/kg, s.c), simultaneamente, o grupo controle recebeu o veículo (óleo de sésamo). Após 24 horas, todos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e o útero foi retirado para a produção do extrato. O útero foi triturado manualmente, sob o gelo, em um homogeneizador tipo Potter contendo 1000 µL de PBS, depois da trituração o extrato foi filtrado em filtro para seringa de 0,45 µm (Chomafil Xtra) e em seguida foi injetado por via subcutânea na bolha de ar. Após os

tempos de 4, 6, 12 e 24 horas, os animais foram sacrificados e realizou-se a contagem total e diferencial de leucócitos a partir do lavado da bolha de ar.

#### **4.5.4 Contagem total de leucócitos**

Após realizado o lavado na bolha de ar, o infiltrado leucocitário foi quantificado através da diluição de 20  $\mu\text{L}$  da amostra em 380  $\mu\text{L}$  da solução de Turk, proporção de 1:20, e a contagem foi realizada em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico (aumento de 40x) e contador manual de células.

#### **4.5.5 Contagem diferencial de leucócitos**

Após coletado o lavado na bolha de ar, foi colocado 75  $\mu\text{L}$  do mesmo na citocentrífuga onde as células foram sedimentadas em lâminas durante 10 minutos a 540 rpm e em seguida coradas por coloração hematoxilina-eosina para a caracterização dos leucócitos presentes de acordo com suas características núcleo-citoplasma observadas ao microscópio óptico utilizando-se objetiva de 100x em óleo de imersão. Em cada lâmina foram contadas 100 células, diferenciando-se os tipos celulares. A quantificação de cada tipo celular foi calculada a partir do percentual encontrado em relação ao número total de células.

#### **4.6 Efeito do Antagonista CCR3 (SB 328437) sobre o Peso de Órgãos**

Após 2 semanas de recuperação da ooforectomia, um grupo de animais recebeu a dose de 3mg/kg do antagonista CCR3 (SB328437) 30 minutos, s.c, antes do tratamento com 17- $\beta$ -estradiol (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , s.c), outro grupo foi tratado apenas com 17- $\beta$ -estradiol (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , s.c), simultaneamente no grupo controle foi aplicado o veículo (óleo de sésamo), depois de 24 horas, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, e em seguida ocorreu à coleta dos seguintes órgãos: útero, baço, diafragma e bexiga para análise dos pesos úmidos e o útero foi colocado em paraformaldeído (PFA) 4% por 24 horas para posterior análise histológica.

#### **4.7 Análise histológica**

Após a coleta dos úteros, estes foram colocados em PFA 4% por 24 horas, armazenado sob refrigeração. Em seguida, os fragmentos fixados em PFA 4% foram



colocados em álcool 70%. Para a inclusão em parafina, estes tecidos foram desidratados em um gradiente de álcoois de 70% a 100%, foram diafanizados em xilol, infiltrados com parafina a 60°C por 1 hora e em seguida, os tecidos foram incluídos na parafina. O corte foi realizado em micrótomo, na espessura de 5µm. A coloração foi realizada com orceína.

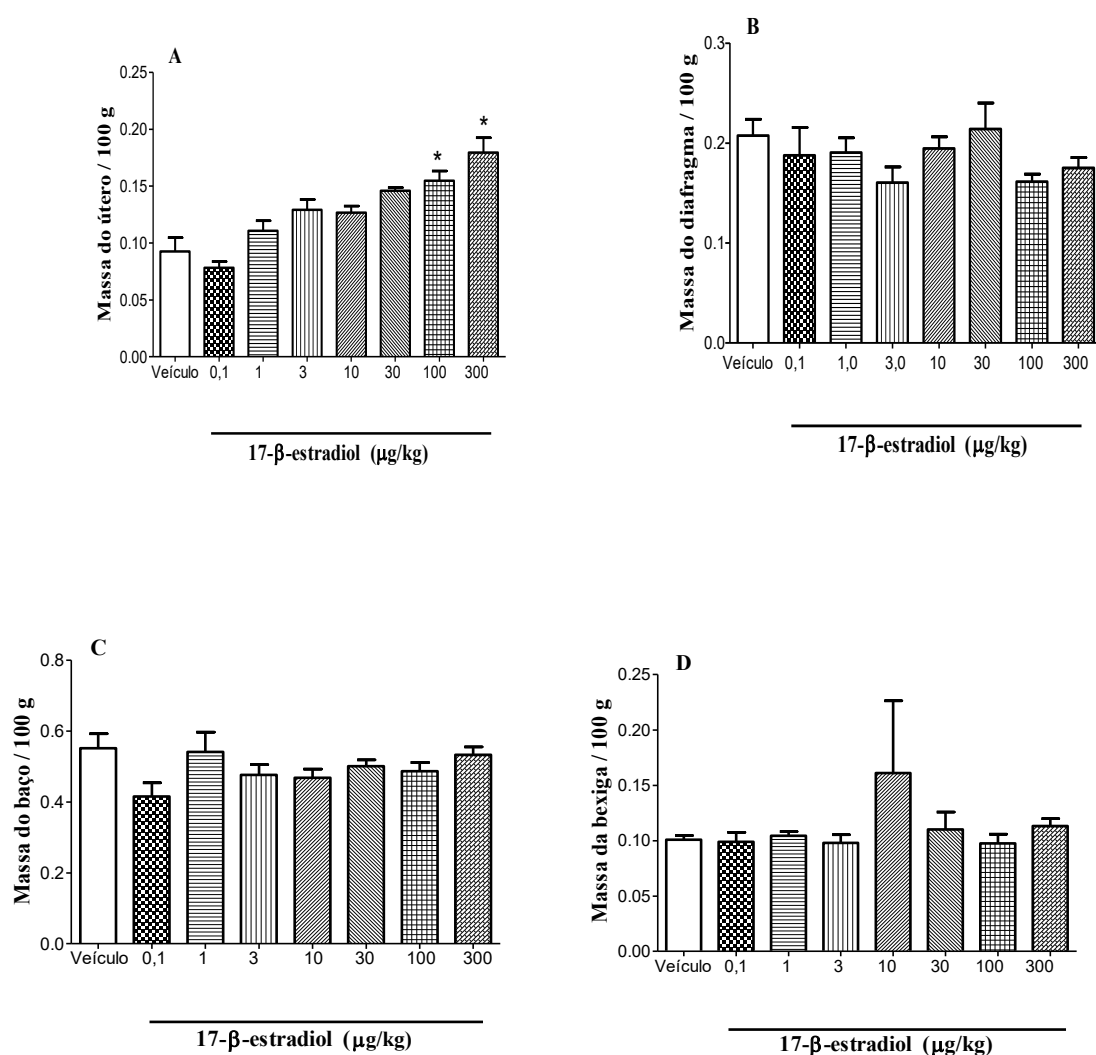
## 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A significância estatística das eventuais diferenças observadas foram determinadas utilizando-se teste T de Students para análise de dois grupos, ou análise de variância (ANOVA) seguida do teste corretivo de Tukey para comparação de três ou mais grupos através do programa GraphPad Prism 5. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Determinação da dose e tempo-resposta no aumento da massa do útero induzido por 17- $\beta$ -estradiol

A migração de eosinófilos para o útero de camundongos fêmeas castradas induzida por 17- $\beta$ -estradiol (0,1; 1; 3; 10; 30; 100 e 300 µg/kg de peso, s.c), baseado no peso úmido dos órgãos, ocorreu de maneira dependente da dose de estrogênio administrada e determinada após 24 horas do estímulo, quando comparado com o grupo controle que foi administrado apenas o óleo de Sésamo (veículo). Verificou-se que nas doses de 100 e 300 µg/kg de 17- $\beta$ -estradiol ocorreu aumento significativo da massa do útero em relação ao grupo controle que recebeu apenas o veículo. Entretanto, não foi observado diferença significativa entre os grupos das doses de 100 e 300 µg/kg de 17- $\beta$ -estradiol (**Figura 1**).

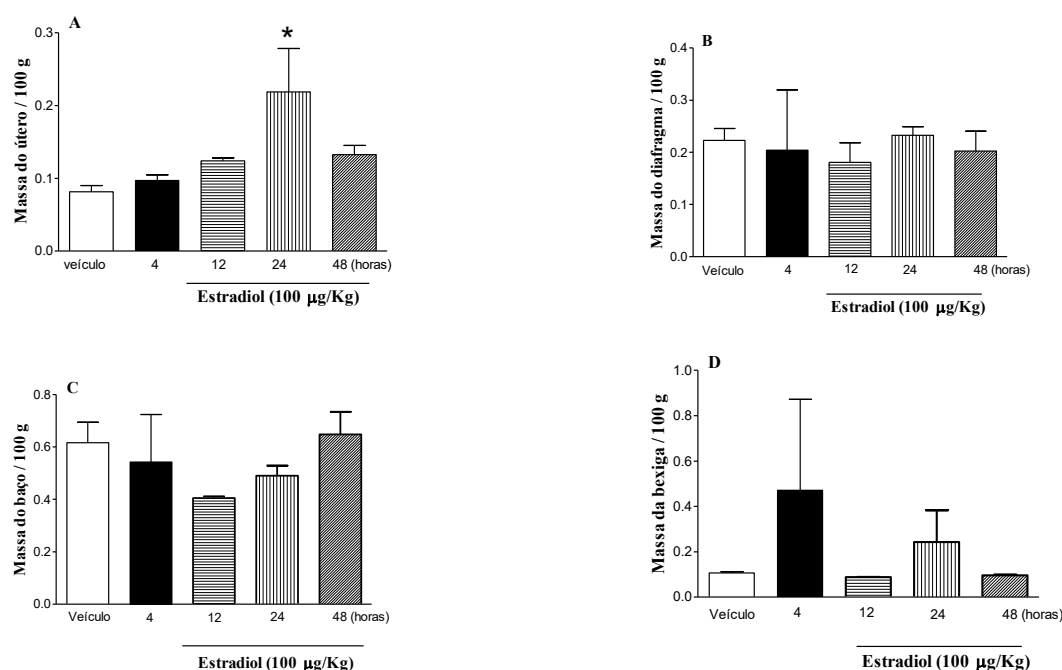


**Figura 1 – 17-β-estradiol induz aumento da massa de útero de maneira dose dependente.** Os animais foram estimulados com 17-β-estradiol (0,1; 1; 3; 10; 30; 100 e 300 μg/kg de peso, s.c.) e coletados os órgãos 24 horas após o estímulo. Painéis A-D: massa dos órgãos, A (útero), B (diafragma), C (baço) e D (bexiga). Os resultados estão expressos como média ± EPM. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo injetado com veículo; (ANOVA seguido do teste de Tukey).

De acordo com o exposto na figura 1A, optou-se pela dose de 100 μg/kg, por ser a menor dose em que apresentou diferença significativa na massa úmida do útero para realização de experimentos posteriores. Nessa dose o aumento da massa úmida do útero foi de 86,24% nos camundongos fêmeas castradas que foram tratadas com 17-β-estradiol em relação ao grupo controle, o qual apenas o veículo (óleo de Sésamo) foi administrado. Ademais, não houve diferença na massa úmida dos demais órgãos analisados. Além do útero, o diafragma foi escolhido por representar um órgão pertencente a região torácica, o baço por ser um órgão linfóide secundário, desse modo tornando-se um representante do sistema imunológico, a bexiga por estar localizada na

região genito-urinária, para que fosse possível a observação da ação do 17- $\beta$ -estradiol em outros órgãos.

A avaliação do tempo de migração de eosinófilos para o útero de camundongos fêmeas castradas induzido por 17- $\beta$ -estradiol (100  $\mu$ g/kg de peso, s.c.) foi realizada pela retirada do útero e demais órgãos nos tempos de 4, 12, 24 e 48 horas após o estímulo. Como observado na **figura 2A**, constatou-se o aumento significativo da massa úmida do útero no tempo de 24 horas. Ainda, foi observado que não houve diferença significativa na massa dos demais órgãos analisados (diafragma, baço e bexiga). Estudos anteriores demonstraram resultados semelhantes quanto a massa do útero em ratas e comprovaram a ocorrência do aumento da infiltração de eosinófilos no útero após administração com o estradiol (TCHERNITCHIN A, et al, 1974; HONG-FANG et al, 2013).



**Figura 2 - 17- $\beta$ -estradiol (100  $\mu$ g/kg) induz aumento da massa de útero de maneira tempo dependente.** Nos animais estimulados com 17- $\beta$ -estradiol (100  $\mu$ g/kg de peso, s.c.) ocorreu um aumento na massa úmida do útero no tempo de 24 horas quando comparada com o grupo dos animais que receberam apenas o veículo (óleo de Sésamo). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo injetado com veículo; (ANOVA seguido do teste de Tukey).

Assim, nossos resultados sugerem uma seletividade do 17- $\beta$ -estradiol administrado por via sistêmica (s.c.) de aumentar a massa do útero e não a massa dos demais órgãos analisados (diafragma, baço e bexiga).

O acúmulo de eosinófilos em condições fisiológicas foi descrito no útero de roedores adultos, durante a fase estro do ciclo estral. Este acúmulo de eosinófilos no

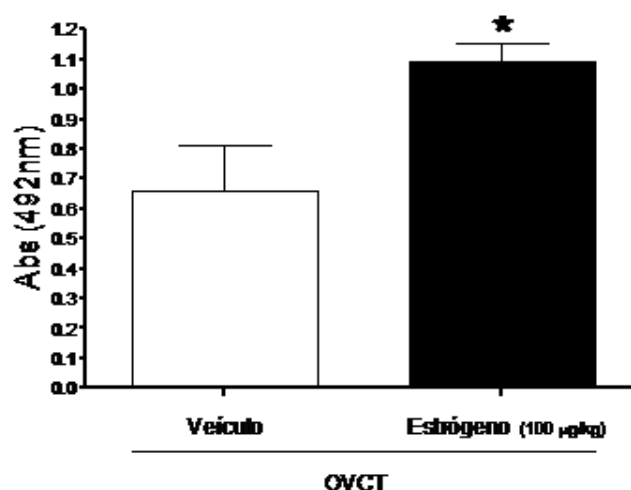
tecido uterino ocorre quando as concentrações séricas de estrogênio se encontram elevados (estro); por outro lado o número de eosinófilos no tecido uterino diminui no diestro (DIENER et al., 2016) ou durante a prenhez, quando predomina a ação da progesterona. Confirmando essa dependência hormonal foi observado que em animais ooforectomizados, os eosinófilos estão ausentes no útero, mas aparecem após a administração de estrogênio (ROSS e KLEBANOFF, 1967). O efeito de induzir a migração de eosinófilos para o útero é exclusivo dos estrogênios uma vez que BJERSING & BORGLIN (1964), testaram vários outros hormônios como a testosterona, progesterona, cortisona e hidrocortisona e observaram que nenhum deles era capaz de induzir a migração.

Corroborando nossos resultados, Hong-Fang e colaboradores (2013) demonstraram um aumento expressivo na permeabilidade microvascular e na infiltração de leucócitos que contribuiu para a formação de um edema estromal, além de um acentuado aumento da massa do útero e da proliferação endometrial após a administração do 17- $\beta$ -estradiol em relação aos animais ooforectomizados.

Estudos anteriores comprovaram que o estradiol aumenta a secreção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) nas células uterinas (Cullivan-Bove & Koos 1993, Shifren et al., 1996, Bausero et al. 1998). Ainda, é documentado que eosinófilos humanos têm a capacidade de produzir VEGF (HORIUCHI e WELLER, 1997). A produção de VEGF pelos eosinófilos pode aumentar a permeabilidade vascular que pode contribuir para a formação do edema e isso pode ocorrer no útero em resposta ao estrogênio (HERVE et al., 2006).

## **6.2 Avaliação da peroxidase de eosinófilos (EPO)**

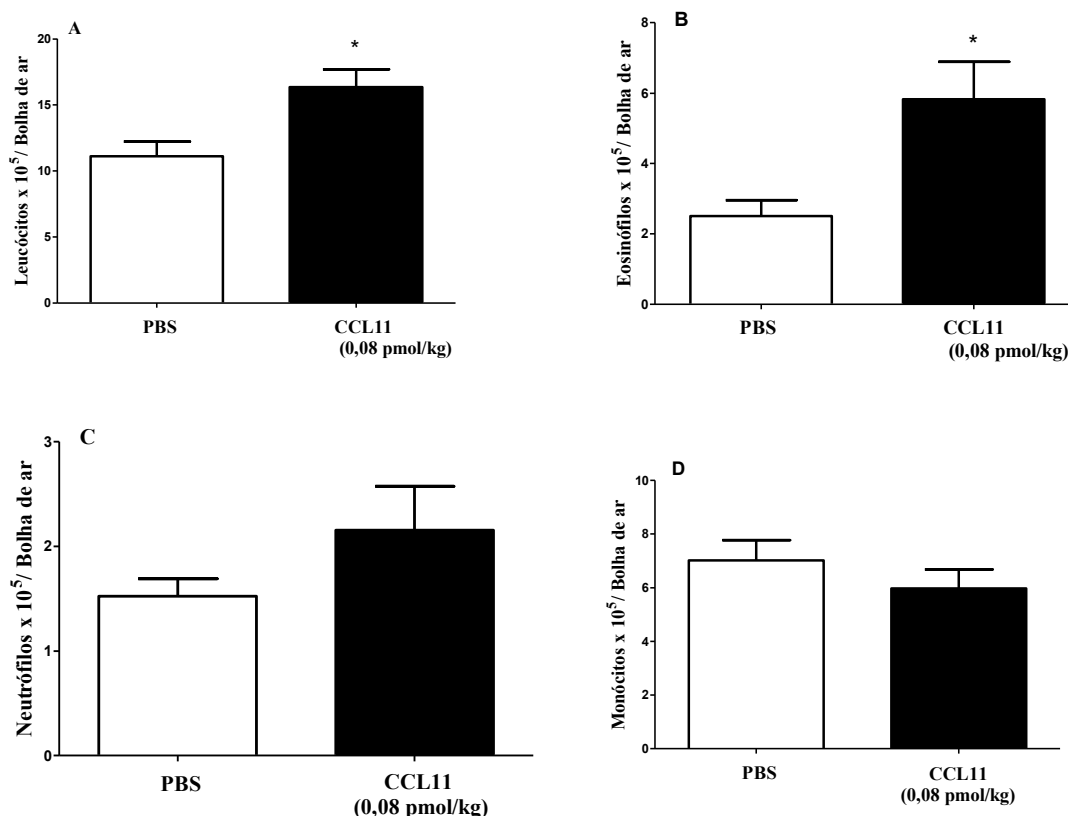
A figura 3 mostra a variação da absorbância da EPO em úteros de animais ooforectomizados. Nos animais estimulados com 17- $\beta$ -estradiol (100  $\mu$ g/kg de peso, s.c.) houve um aumento da atividade dessa enzima quando comparados aos animais induzidos com o veículo (óleo de Sésamo).



**Figura 3 – Determinação da medida da absorbância de peroxidase de eosinófilo (EPO).** Animais ooforectomizados (OVCT) induzidos com 17- $\beta$ -estradiol (100  $\mu$ g/kg de peso, s.c.) e com veículo (óleo de sésamo). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo injetado com veículo; (Teste T de Students).

## 6.2 Efeito da CCL11 no modelo em bolha de ar

Como observado na **figura 4A**, a CCL11 na dose de 0,08 pmol/kg induziu migração de leucócitos, particularmente induzindo de modo significativo a migração de eosinófilos (**Figura 4B**) para a bolha de ar em camundongos C57/Bl6. Ademais, a CCL11 não alterou a migração de neutrófilos e de células mononucleares no modelo de bolha de ar, como observado na **figura 4C e 4D**, respectivamente. Corroborando nossos resultados, OKIGAMI et al. (2007) demonstraram que a CCL-11 na dose de 3  $\mu$ g/animal, s.c. juntamente com a IL-5 por via i.v., induzem migração de eosinófilos para a bolha de ar e que a integrina VLA-4 está envolvida nessa migração dos eosinófilos. Ainda, a CCL-11 na dose de 0,02 pmol/kg em conjunto com a heparina por via s.c. induzem a migração de eosinófilos através de uma polarização de linfócitos Th2 (ELLYARD et al., 2007).



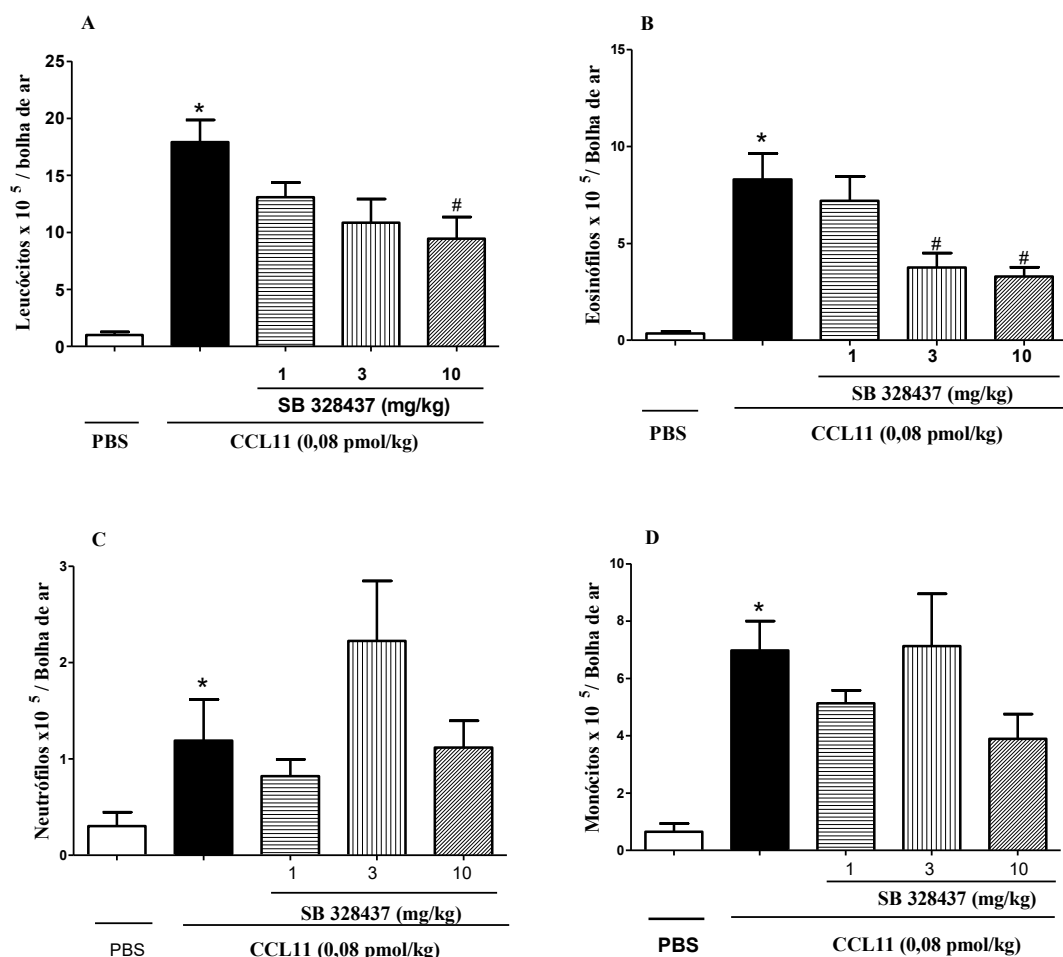
**Figura 4 – Efeito da CCL-11 em modelo de bolha de ar.** A CCL-11 foi administrada na dose de 0,08 pmol/kg na bolha de ar. Após 4 horas foi coletado o lavado da bolha de ar para a avaliação da migração de leucócitos. Painéis A-D: A (contagem total de leucócitos), B (eosinófilos), C (Neutrófilos), D (monócitos). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo estimulado com PBS; (Teste T de Students).

### 6.3 Determinação da dose do antagonista CCR3 (SB32843)

O efeito do antagonista CCR3 (SB328437) foi avaliado sobre a migração de leucócitos induzida por CCL-11. Verificou-se que o antagonista de CCR3 na dose de 10 mg/kg reduziu a migração de leucócitos totais (Figura 5A), bem como a migração de eosinófilos (Figura 5B) quando comparado ao grupo de animais que foram injetados somente com CCL-11. Ainda, as outras doses de antagonista CCR3 (1 e 3 mg/kg) não reduziram a migração de leucócitos totais (Figura 5A), entretanto, o número de eosinófilos se mostra significativamente diminuído na dose de 3mg/kg (Figura 5B).

Constatando o efeito do antagonista CCR3 em outro modelo experimental, o mesmo reduziu a produção de CCL-11 nos pulmões de camundongos que receberam a transferência de linfócitos Th2 e verificou-se que não houve redução da produção de

CCL-11 nos animais que receberam os linfócitos Th1, sugerindo a diminuição da síntese da quimiocina envolvendo uma inibição seletiva do infiltrado de eosinófilos dependentes de Th2 (MORI et al., 2007).



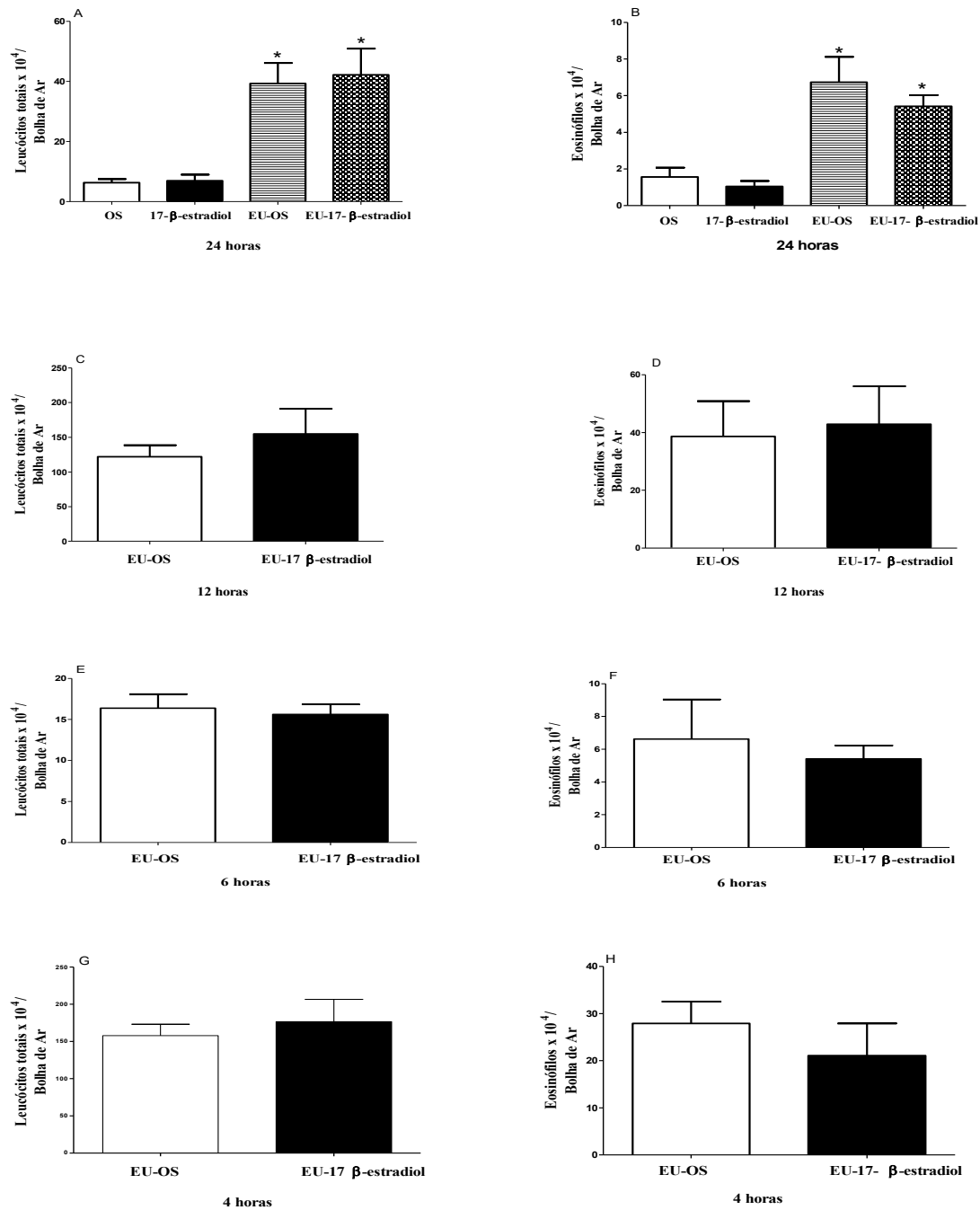
**Figura 5 - Efeito do antagonista CCR3 (SB 328437) sobre a migração de leucócitos induzida por CCL-11.** O antagonista CCR3 foi administrado nas doses de 1, 3 ou 10 mg/kg, por via s.c., 30 minutos antes da administração de CCL-11 (0,08 pmol/kg) na bolha de ar. Após 4 horas, foi coletado o lavado da bolha de ar para avaliação da migração de leucócitos. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM, ANOVA seguido do teste de Tukey. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo injetado com PBS; # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo administrado com CCL-11.

#### 6.4 Efeito do extrato de útero

A avaliação do efeito do extrato de útero, que foi obtido de animais ooforectomizados que receberam 17- $\beta$ -estradiol (100  $\mu$ g/kg) e de animais ooforectomizados que receberam apenas o veículo (óleo de Sésamo), foi realizada a partir da contagem total e diferencial dos leucócitos que migraram para a bolha de ar. Esse experimento foi feito com o intuito de verificar se alguma célula do tecido uterino produz citocinas recrutadoras de eosinófilos e em qual tempo o útero produziria essas citocinas.

Nas figuras 6 (A e B) estão apresentados os valores referentes a contagem de leucócitos totais e de eosinófilos, respectivamente, 24 horas após a administração do extrato de útero. Na contagem de leucócitos totais observou-se um aumento significativo de células nos grupos que receberam extrato de útero com e sem aplicação do 17- $\beta$ -estradiol quando comparado com os grupos que receberam apenas o veículo (óleo de sésamo) ou somente o 17- $\beta$ -estradiol. Ademais, com a quantidade de eosinófilos ocorreu de forma semelhante, não havendo diferença expressiva na migração entre os grupos extrato de útero estimulado com óleo de Sésamo (**EU-OS**) e extrato de útero com 17- $\beta$ -estradiol (**EU-17- $\beta$ -estradiol**). Considerando os outros tipos celulares (mononucleares e neutrófilos) também não foi encontrada diferença significativa entre os grupos (dados não mostrados).





**Figura 6- Tempo resposta do extrato de útero na migração de leucócitos em modelo de bolha de ar.** (A, B) Contagem total de leucócitos e diferencial de eosinófilos 24 horas após injeção subcutânea em bolha de ar do veículo (óleo de sésamo, OS), 17-β- estradiol, extrato de útero (EU) de animais ooforetomizados tratado com OS (EU-OS), extrato de útero de animais ooforetomizados tratados com 17-β-estradiol (EU-17-β- estradiol). (C - H) Contagem total de leucócitos e diferencial de eosinófilos: 12 horas (C, D) 6 horas (E, F), 4 horas (G, H) após injeção subcutânea em bolha de ar do extrato de útero de animais ooforetomizados tratado com EU-OS e com EU-17-β- estradiol. Os resultados estão expressos como média ± EPM. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo injetado com OS e 17-β- estradiol; (ANOVA seguido do teste de Tukey).

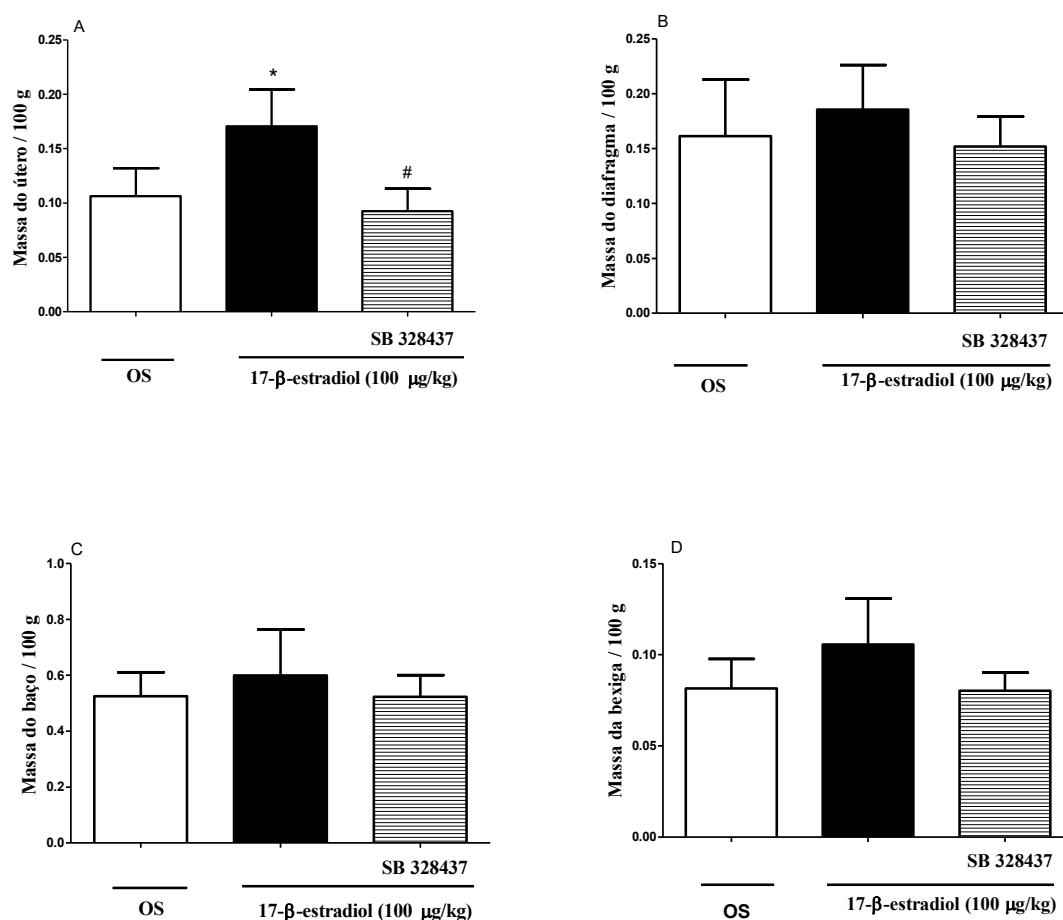
Nos tempos de 12, 6 e 4 horas após a injeção do EU-OS e EU-17-β-estradiol, ocorreu de forma similar aos valores encontrados no tempo de 24 horas, como

observado na **figura 6** (C-H) não ocorreu diferença na contagem de leucócitos totais e diferencial de eosinófilos, detalhadamente, nos tempos de 12 horas (C e D), 6 horas (E e F) e 4 horas (G e H). Ainda, não foi observado diferença na contagem diferencial de mononucleares e neutrófilos nos mesmos grupos (dados não mostrados).

Os resultados referentes a **figura 6** sugerem o envolvimento de células uterinas e/ou seus produtos no recrutamento de eosinófilos para a bolha de ar dos camundongos quando comparamos os grupos que receberam os extratos uterinos com e sem o 17- $\beta$ -estradiol e os que receberam apenas o óleo de Sésamo ou apenas o 17- $\beta$ -estradiol. Entretanto, esperava-se que houvesse diferença significativa no número de eosinófilos entre os grupos em que foram administrados o extrato de útero com o óleo de Sésamo e extrato de útero com o 17- $\beta$ -estradiol. A hipótese para justificar a ausência de diferença no número de eosinófilos entre esses grupos é de que pode ter ocorrido a degradação de alguma citocina envolvida no processo de migração dessas células, apesar dos cuidados tomados como a preparação dos extratos sobre o gelo. Ainda, pode não ter ocorrido a liberação das citocinas durante a homogeneização do tecido uterino. Desse modo, novos experimentos deverão ser realizados para a confirmação dessa hipótese.

### 6.5 Efeito do antagonista CCR3 sobre a massa úmida de órgãos

De acordo com a **figura 7**, observou-se a influência do 17- $\beta$ -estradiol e do antagonista CCR3 (SB 328437) sobre o peso úmido de órgãos como: útero, diafragma, baço e bexiga. No **painel A** visualiza-se o aumento significativo na massa do útero frente ao estímulo com 17-  $\beta$ -estradiol (100  $\mu$ g/kg de peso, s.c.) comparado com o grupo controle que recebeu o veículo óleo de sésamo (OS). Contudo, o grupo experimental que recebeu a dose de 3mg/kg, s.c. do antagonista CCR3 (SB 328437) 30 minutos antes da administração com 17-  $\beta$ -estradiol (100  $\mu$ g/kg de peso, s.c.) apresentou diminuição significativa na massa do útero ao ser comparado com o grupo experimental que recebeu apenas o estrogênio. Na **figura 7**, painéis B, C e D não foi observada diferença significativa no peso dos demais órgãos entre os grupos.

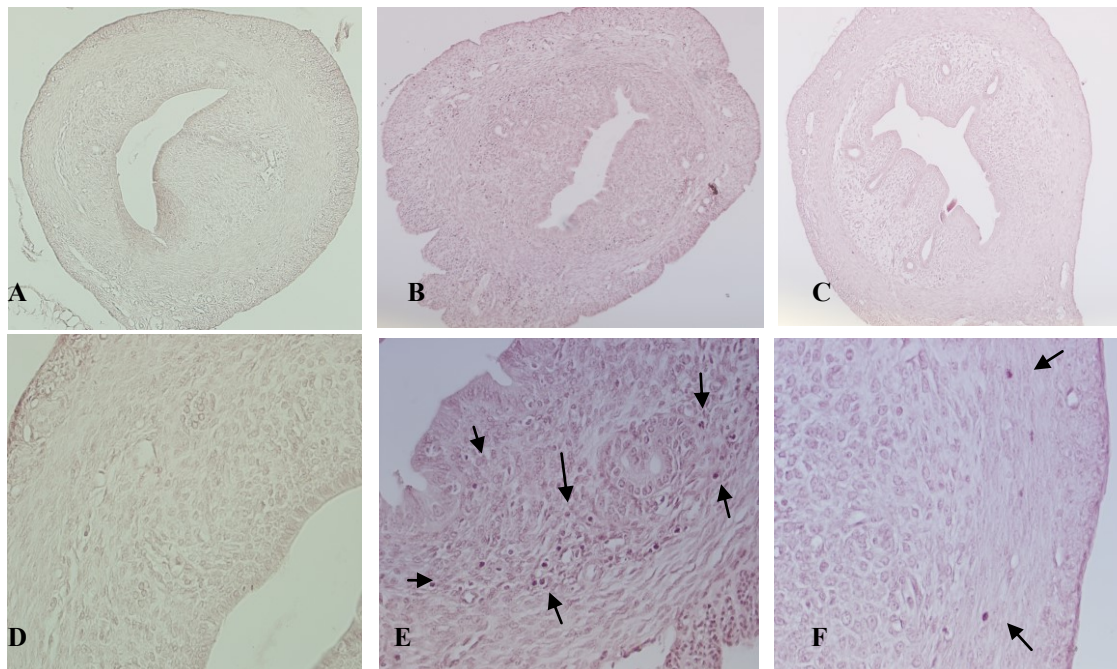


**Figura 7 - Efeito do antagonista CCR3 (SB 328437) sobre a massa de diferentes órgãos induzida por 17-β-estradiol (100 µg/kg de peso, s.c.).** Um grupo de animais recebeu a dose de 3 mg /kg do antagonista CCR3 (SB 328437) 30 minutos antes de ser injetado o 17-β-estradiol (100 µg/kg de peso, s.c.). Outro grupo recebeu 17-β-estradiol (100 µg/kg de peso, s.c.) e o grupo controle recebeu apenas óleo de sésamo (OS). Após 24 horas os animais foram eutanasiados e os órgãos (útero, diafragma, baço, bexiga) foram retirados e pesados em balança analítica. Os resultados estão expressos como média ± EPM. \* $p < 0,05$  quando comparado ao grupo OS; # $p < 0,05$  quando comparado ao grupo injetado com 17-β-estradiol; (ANOVA seguido do teste de Tukey).

Corroborando este estudo, Zang Jin et al., 2000, demonstraram que os receptores CCR3 são intensamente expressos em eosinófilos localizados intravascularmente em todas as partes do tecido uterino e extravascularmente durante a fase menstrual. Além disso, constatou-se a expressão do receptor CCR3 em outras células epiteliais, sendo que seus níveis variaram de acordo com o tipo de célula e o estágio do ciclo menstrual, como por exemplo, sua presença nas células epiteliais glandulares e luminal, com expressão de picos na fase proliferativa tardia do ciclo menstrual.

## 6.6 Análise Histológica

As secções do útero foram feitas a partir dos grupos tratados com Óleo de Sésamo (controle) (A-D), 17- $\beta$ -estradiol (B-E) e antagonista do receptor CCR3(SB 328437) com 17- $\beta$ -estradiol (C-F).



**Figura 8 – Corte histológico.** Secções de 5 $\mu$ m em parafina, corados com orceína, de tecido uterino de animais C57/BL6, ooforectomizados, 24 horas após estímulo com veículo (A, D), 100  $\mu$ g/kg de 17- $\beta$ -estradiol (B, E) e SB 328437 com 17- $\beta$ -estradiol. Aumento de 10X (A, B, C). Aumento de 40X (D, E, F).

A partir do exposto acima, pode-se observar que no grupo de animais que receberam apenas o óleo de Sésamo (figuras 8A e 8D) não foram encontrados eosinófilos no útero. Entretanto, no grupo de animais em que foi administrado o 17- $\beta$ -estradiol, na dose de 100  $\mu$ g/kg (figuras 8B e 8E), ocorreu um aumento no número de eosinófilos presentes no útero, embora não foi possível a quantificação dos mesmos. Além disso, no grupo de animais em que foi administrado o antagonista do receptor CCR3(SB 328437) com 17- $\beta$ -estradiol (figuras 8C e 8F) pode-se notar a redução do número de eosinófilos no tecido uterino, comprovando o efeito do antagonista do receptor CCR3 sobre a migração de eosinófilos para o útero de camundongos induzido por estrogênio.

## 7. CONCLUSÃO

Nesse estudo concluímos que:

- O 17- $\beta$ -estradiol induz a migração de eosinófilos para o útero de camundongos fêmeas castradas.
- A CCL11 induz a migração de eosinófilos para a bolha de ar em camundongos fêmeas C57/BL6.
- O antagonista do receptor CCR3 (SB 328437) na dose de 3 mg/kg reduz significativamente o recrutamento de eosinófilos para a bolha de ar quando comparado com animais que receberam apenas a quimiocina CCL-11. Além disso, o antagonista do receptor CCR3 provoca também uma diminuição do peso úmido do útero sugerindo uma inibição da migração de eosinófilos para o útero de animais tratados com 17- $\beta$ -estradiol (100  $\mu$ g/kg).
- O extrato de útero com e sem aplicação do 17- $\beta$ -Estradiol não provocou diferença no padrão celular do lavado intra bolha de ar nos tempos de 4, 6, 12 e 24 horas após injeção do extrato.
- Através da histologia do tecido uterino pôde-se comprovar a redução do número de eosinófilos no tecido uterino a partir da administração do antagonista do receptor CCR3.

Sendo assim, o receptor CCR3 está envolvido na migração de eosinófilos para o útero de camundongos induzida por 17- $\beta$ -estradiol.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-GHAZALEH R. I., DUNNETTE S. L., LOEGERING D. A., CHECKEL J. L., KITA H., THOMAS L. L., GLEICH G. J. Eosinophil granule proteins in peripheral blood granulocytes. **J. Leukoc. Biol.** 52: 611–618, 1998.

ACHARYA K. R., ACKERMAN S. J. Eosinophil Granule Proteins: Form and Function. **The Journal of Biological Chemistry.** 289 (25):17406-17415, 2014.

ACEVES S.S. Tissue remodeling in patients with eosinophilic esophagitis: what lies beneath the surface? **J Allergy Clin Immunol.** 128(5):1047-1049, 2011.

AKIYAMA M., OKABE H., TAKAKURA K., FUJIYAMA Y., NODA Y. Expression of macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) in human endometrium throughout the menstrual cycle. **Br J Obstet Gynaecol** 106:725–730, 1999.

AUSTEN K.F. Homeostasis of effector systems which can also be recruited for immunologic reactions. **J Immunol.** 1978;121(3):793-805.

BAUSERO P., FREITAS S., MEDURI G., PERROT-APPLANAT M. Paracrine action of VEGF in the human endometrium: regulation by ovarian steroids. **Angiogenesis.** 2: 167–182, 1998.

BOIX E., CARRERAS E., NIKOLOVSKI Z., CUCHILO C.M., NOGUÉS M.V. Identification and characterization of human eosinophil cationic protein by an epitope-specific antibody. **J Leukoc Biol.** 69(6):1027-35, 2001.

BUONOCORE S. *et al.* Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. **Nature**, 464: 1371–1375, 2010.

CARVALHO A. T. P., ELIA C. C. S., DE SOUZA H. S. P. *et al.* Immunohistochemical study of intestinal eosinophils in Inflammatory Bowel Disease. **J Clin Gastroenterol**, 36(2): 120-125, 2003.

CHAWLA A., NGUYEN K.D., GOH Y.P. Macrophage mediated inflammation in metabolic disease. **Nat Rev Immunol.** 11(11):738-749. 2011.

CORDING, S., MEDVEDOVIC J., CHERRIER M., EBERL G. Development and regulation of ROR $\gamma$ t (+) innate lymphoid cells. **FEBS Lett.** 588: 4176–4181, 2014.

CULLIVAN-BOVE K., KOOS R.D. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus: rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen-induced increases in uterine capillary permeability and growth. **Endocrinology.** 133: 829–837, 1993.

CURI M.O.M. Estudo dos mecanismos envolvidos na migração de eosinófilo para útero de camundongos fêmeas castradas induzido por 17- $\beta$ -estradiol. 1998, p. 70. **Dissertação. USP – Faculdade de medicina de Ribeirão Preto**, 1998.

DANESHPOUY, M.; SOCIE, G.; LEMANN, M. et al. Activated eosinophils in upper gastrointestinal tract of patients with graft-versus-host disease. **Blood**. 99(8): 3033-3040, 2002.

DIENER K. R., ROBERTSON S. A., HAYBALL J. D., LOUSBERG E. L. Multi-parameter flow cytometric analysis of uterine immune cell fluctuations over the murine estrous cycle. **Journal of Reproductive Immunology**. V. 113, p. 61-67, 2016.

DOMACHOWSKE J. B., DYER K. D., ADAMS A. G., LETO T. L., ROSENBERG H. F. Eosinophil cationic protein/RNase 3 is another RNase A-family ribonuclease with direct antiviral activity. **Nucleic Acids Res**. 26: 3358–3363, 1998.

DAUSSY C., FAURE F., MAYOL K., VIEL S., GASTEIGER G., CHARRIER E., BIENVENU J., HENRY T., DEBIEN E., HASAN U. A., et al. T-bet and Eomes instruct the development of two distinct natural killer cell lineages in the liver and in the bone marrow. *J. Exp. Med.* 211: 563–577, 2014.

ERJEFÄLT, J. S.; PERSSON C. G. A. New Aspects of Degranulation and Fates of Airway Mucosal Eosinophils. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 161(6): 2074-2085, 2000.

EGESTEN, A.; CALAFAT, J.; JANSSEN, H. et al. Granules of human eosinophilic leucocytes and their mobilization. **Clinical and Experimental Allergy**, 31: 1173-1188, 2001.

FREDENS K., DAHL R., VENGE P. The Gordon phenomenon induced by the eosinophil cationic protein and eosinophil protein X. **J. Allergy Clin. Immunol.** 70: 361–366, 1982.

FURUTA G.T., ATKINS F.D., LEE N.A., LEE J.J. Changing roles of eosinophils in health and disease.

GARCIA-ZEPEDA E. A., ROTHENBERG M.E., OWNBEY R. T., CELESTIN J., LEDER P., LUSTER A.D. Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. **Nat. Med.** 2: 449-456, 1996.

GIEMBYCZ, M. A.; LINDSAY, M. A. Pharmacology of the Eosinophil. **Pharmacological Reviews**, 51(2): 213-340, 1999.

GLEICH G. J., LOEGERING D. A., BELL M. P., CHECKEL J. L., ACKERMAN S. J., MCKEAN D. J. Biochemical and functional similarities between human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein: homology with ribonuclease. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 83: 3146–3150, 1986.

GOUON-EVANS V., POLLARD J. W. Eotaxin is required for eosinophil homing into the stroma of the pubertal and cycling uterus. **The Endocrine Society.** 142 (10):4515–4521, 2001.

GRIMALDI J. C., YU N., X., GRUNIG G., SEYMOUR B., W., COTTREZ F., ROBINSON D. S., HOSKEN N., FERLIN W. G., WU X., SOTO H., O’GARRA A., HOWARD M. C., COFFMAN R. L: Depletion of eosinophils in mice through the use of antibodies specific for C-C chemokine receptor 3 (CCR3). **J Leukoc Biol.** 65:846–853, 1999.

HAMPTON A. L., ROGERS P.A., AFFANDI B., SALAMONSEN L.A. Expression of the chemokines, monocyte chemotactic protein (MCP)-1 and MCP-2 in endometrium of normal women and Norplant users, does not support a central role in macrophage infiltration into endometrium. **J Reprod Immunol** 49:115–132, 2001.



HERVE M.A., MEDURI G., PETIT F.G., DOMET T.S., LAZENNEC G., MOURAH S., PERROT-APPLANAT M. Regulation of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flk-1/KDR by estradiol through VEGF in uterus. *J Endocrinol* 2006;

VALENT, P. The phenotype of human eosinophils, basophils, and mast cells.

**J Allergy Clin Immunol**, 94: 1177-83, 1994.

HOGAN S.P., ROSENBERG H.F., MOQBEL R., PHIPPS S., FOSTER P.S., LACY P., KAY A.B., ROTHENBERG M.E. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. **Clin Exp Allergy**. 38:709– 750, 2008.

HONG-FANG L., DUAN Y., WANG L., TIAN Z.F., QIU X.Q., ZHANG Y., ZHANG H., YANG L. Effects of estrogen and phytoestrogens on endometrial leakage in ovariectomized rats and the related mechanisms. **Acta Physiologica Sinica**. 65(1): 8–18, 2013.

HORIUCHI T., WELLER P.F. Expression of vascular endothelial growth factor by human eosinophils: upregulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5. **Am J Respir Cell Mol Biol** 1997; 17(1): 70–77.

HORNUNG D., RYAN I.P., CHAO V.A., VIGNE J.L., SCHRIOCK E.D., TAYLOR R.N. Immunolocalization and regulation of the chemokine RANTES in human endometrial and endometriosis tissues and cells. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1621–1628, 1997.

JACOBSEN E.A., HELMERS R.A., LEE J.J, LEE N. A. The expanding role(s) of eosinophils in health and disease. **Blood**, v. 120, n. 19, p. 3882 -3890, 2012.

JONES R.L., KELLY R.W., CRITCHLEY H.O. Chemokine and cyclooxygenase-2 expression in human endometrium coincides with leukocyte accumulation. **Hum Reprod** 12:1300 –1306, 1997.

KITA, H.; GLEICH, G. J. Chemokines Active on Eosinophils: Potential Roles in Allergic Inflammation. **J. Exp. Med.**, 183: 2421-2426, 1996.

KITA H, WEILER D. A., ABU-GHAZALEH R., SANDERSON C.J., GLEICH G.J. Release of granule proteins from eosinophils cultured with IL-5. **J Immunol.**; 149:629–635, 1992.

KUNKEL E.J., CAMPBELL D.J., BUTCHER E.C. Chemokines in lymphocyte trafficking and intestinal immunity. **Microcirculation**.10:313–323, 2003.

LAMPINEN M., BACKMAN M., WINGVIST O, et al. Different regulation of eosinophil activity in Crohn's disease compared with ulcerative colitis. **J. Leukoc. Biol.** 84(6): 1392-1399, 2008.

LUQUE E. H., MUNOZ DE TORO M.M., RAMOS J. G., RODRIGUEZ H.A, SHERWOOD O.D. Role of relaxin and estrogen in the control of eosinophilic invasion and colla-gen remodeling in rat cervical tissue at term. **Biol Reprod.** 59:795–800, 1998.

MEDOFF B.D., THOMAS S.Y., LJUSTER A.D. T cell trafficking in allergic asthma: the ins and outs. **Annu. Rev. Immunol.** 26: 205-232, 2008.

MISHRA A., HOGAN S., LEE J., FOSTER P., ROTHENBERG M. Fundamental signals that regulate eosinophil homing to the gastrointestinal tract. **J Clin Invest.** 103:1719–1727, 1999.

MJÖSBORG J.M. *et al.* Human IL-25– and IL-33–responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CCR4 and CD161. **Nat. Immunol.** 12: 1055–1062, 2011.

MOCHIZUKI M., BARTELS J., MALLET A. I., CHRISTOPHERS E., SCHRODER J. M. IL-4 induces eotaxin: a possible mechanism of selective eosinophil recruitment in helminth infection and atopy. **J Immunol.** 160 (1):60–8, 1998.

NUSSBAUM J. C., VAN DYKEN S. J., VON MOLTKE J., CHENG L. E., MOHAPATRA A., MOLOFSKY A. B., Thornton E. E., KRUMMEL M. F., Chawla

A., LIANG H. E., LOCKSLEY R. M. Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis. *Nature* 502: 245–248, 2013.

OKIGAMI H, TAKESHITA K, TAJIMI M, KOMURA H, ALBERS M, LEHMANN TE, RÖLLE T, BACON KB. Inhibition of eosinophilia in vivo by a small molecule inhibitor of verylate antigen (VLA)-4. **European Journal of Pharmacology**, v. 22 p. 202- 209, 2007.

PAPADAKIS K.A., PREHN J., NELSON V., CHENG L., BINDER S.W., PONANTH P.D., ANDREW D.P., TARGAN S.R. The role of thymus-expressed chemokine and its receptor CCR9 on lymphocytes in the regional specialization of the mucosal immune system. **J Immunol** 165:5069 –5076, 2000.

POPKEN-HARRIS P., CHECKEL J., LOEGERING D., MADDEN B., SPRINGETT M., KEPHART G., GLEICH G.J. Regulation and processing of a precursor form of eosinophil granule major basic protein (ProMBP) in differentiating eosinophils. **Blood**. 92:623–631, 1998.

ROBERTSON S. A., MAU V. J., YOUNG I. G., MATTHAEI K. I. Uterine eosinophils and reproductive performance in interleukin 5 – deficient mice. **Journal of Reproduction and fertility**. v.120, p. 423-432, 2000.

ROBINETTE M. L., FUCHS A., CORTEZ V. S., LEE J. S., WANG Y., DURUM S. K., GILFILLAN S., COLONNA M. Immunological Genome Consortium. Transcriptional programs define molecular characteristics of innate lymphoid cell classes and subsets. **Nat. Immunol.** 16: 306–317, 2015.

ROSENBERG H. F. Recombinant human eosinophil cationic protein: ribonuclease activity is not essential for cytotoxicity. **J. Biol. Chem.** 270: 7876–7881, 1995.

ROSS R., KLEBANOFF S.J. The eosinophilic leukocyte. Fine structure studies of changes in the uterus during the estrous cycle. **J Exp Med.** 124:653–60, 1966.

ROTHENBERG, M.E.; HOGAN, S.P. The eosinophil. **Annual Review of Immunology**, v. 24, p. 147-174, 2006.

ROTHENBERG, M. E. Eosinophilia. **N Engl J Med**, 338(22): 1592-1600, 1998.

SAWA S. et al. Lineage relationship analysis of ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> innate lymphoid cells. **Science** 330: 665–669, 2010.

SHAMRI R., XENAKIS J. J., SPENCER L. A. Eosinophils in innate immunity: an evolving story. **Cell Tissue res.** v. 343, p. 57-83, 2011.

SHIFREN J.L., TSENG J.F., ZALOUDEK C.J. Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 81: 3112–3118, 1996.

SKUBITZ K.M. Neutrophilic leukocytes. In: Greer J, editor. **Wintrobe's Clinical Hematology** 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p 268-310, 2004.

SONNENBERG G.F., MJJÖSBURG J., SPITS H., ARTIS D. SnapShot: innate lymphoid cells. **Immunity** 39: 622, 2013.

SPITS, H. et al. Innate lymphoid cells—a proposal for uniform nomenclature. **Nat. Rev. Immunol.** 13: 145–149, 2013

TCHERNITCHIN A., ROORIJCK J., TCHERNITCHIN X., VANDENHENDE J., GALAND F. Dramatic early increase in uterine eosinophils after oestrogen administration. **Nature**, v. 248, n. 5444, p.142-143, 1974.

TEPPER, R. I. The eosinophil-mediated antitumor activity of interleukin-4. **J. Allergy Clin Immunol**, 94: 1225-31, 1994.

TIMMONS B.C., FAIRHURST A.M., MAHENDROO M.S. Temporal changes in myeloid cells in the cervix during pregnancy and parturition. **J Immunol.** V.182, p. 2700-2707, 2009.

UHM T. G., KIM B. S., CHUNG I.Y. Eosinophil development, regulation of eosinophil-specific genes, and role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. **Allergy Asthma Immunol Res.** 4(2): 68-79, 2012.

YANG D., CHEN Q., ROSENBERG H. F., RYBAK S. M., NEWTON D. L., WANG Z. Y., FU Q., TCHERNEV V. T., WANG M., SCHWEITZER B., KINGSMORE S. F., PATEL D. D., OPPENHEIM J. J., HOWARD O. M. Human ribonuclease A superfamily members, eosinophil-derived neurotoxin and pancreatic ribonuclease, induce dendritic cell maturation and activation, **J. Immunol.** 173: 6134–6142, 2004.

YANG D., CHEN Q., SU S. B., ZHANG P., KUROSAKA K., CASPI R. R., MICHALEK S. M., ROSENBERG H. F., ZHANG N., OPPENHEIM J. J. Eosinophil-derived neurotoxin acts as an alarmin to activate the TLR2-MyD88 signal pathway in dendritic cells and enhances Th2 immune responses. **J. Exp. Med.** 205: 79–90, 2008.

WALKER J.A., BARLOW J.L., MCKENZIE A.N. Innate lymphoid cells—how did we miss them? **Nat. Rev. Immunol.** 13: 75–87, 2013.

WANG Y.H, ANGKASEKWINAI P., LU N., VOO K.S., ARIMA K., HANABUCHI S., HIPPE A., CORRIGAN C.J., DONG C., HOMEY B., YAO Z., YING S., HUSTON D.P., LIU, Y. J. IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. **J. Exp. Med.** 204: 1837- 1847, 2007.

WENG M., BARON D. M., BLOCH K.D., LUSTER A. D., LEE J.J., MEDOFF B. D. Eosinophils are necessary for pulmonary arterial remodelling in a mouse model of eosinophilic inflammation-induced pulmonary hypertension. **J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.** 301(6): L927-L936, 2011.

ZHANG J., LATHBURY L. J., SALAMONSEN L. A. Expression of the chemokine eotaxin and its receptor, CCR3, in human endometrium. **Biology of Reproduction**. 62: 404-411, 2000.